

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Brigitte BATHE, et al.

GAU:

SERIAL NO: New Application

EXAMINER:

FILED: Herewith

FOR: PROCESS FOR THE PRODUCTION OF L-LYSINE USING CORYNEFORM BACTERIA

REQUEST FOR PRIORITY

COMMISSIONER FOR PATENTS
ALEXANDRIA, VIRGINIA 22313

SIR:

- ☐ Full benefit of the filing date of U.S. Application Serial Number , filed , is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- ☒ Full benefit of the filing date(s) of U.S. Provisional Application(s) is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e):
- | <u>Application No.</u> | <u>Date Filed</u> |
|------------------------|-------------------|
| 60/401,752 | August 8, 2002 |
- ☒ Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below.

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:

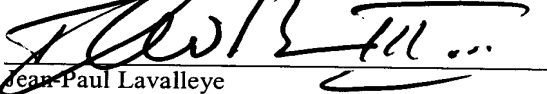
<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
Germany	102 35 029.9	July 31, 2002

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☒ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☐ were filed in prior application Serial No. filed
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and
- ☐ (B) Application Serial No.(s)
- ☐ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.


Jean-Paul Lavalleye

Registration No. 31,451



22850

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 102 35 029.9

Anmeldetag: 31. Juli 2002

Anmelder/Inhaber: Degussa AG,
Düsseldorf/DE

Bezeichnung: Verfahren zur Herstellung von L-Lysin unter
Verwendung coryneformer Bakterien

IPC: C 12 P, C 12 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 20. Juni 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag



Wehner

**Verfahren zur Herstellung von L-Lysin unter Verwendung
coryneformer Bakterien**

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von L-Lysin, unter Verwendung coryneformer Bakterien, die
5 sensitiv gegen Diaminopimelinsäure-Analoga, insbesondere 4-Hydroxy-Diaminopimelinsäure, sind.

Stand der Technik

L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin, finden in der Humanmedizin und in der pharmazeutischen Industrie, in der
10 Lebensmittelindustrie und ganz besonders in der Tierernährung Anwendung.

Es ist bekannt, dass Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere Corynebacterium glutamicum hergestellt werden. Wegen der
15 großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien wie zum Beispiel die
20 Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zur Produktform durch zum Beispiel Ionenaustauschchromatographie oder die intrinsischen Leistungseigenschaften des Mikroorganismus selbst betreffen.

25 Zur Verbesserung der Leistungseigenschaften dieser Mikroorganismen werden Methoden der Mutagenese, Selektion und Mutantenauswahl angewendet. Auf diese Weise erhält man Stämme, die resistent gegen Antimetabolite wie zum Beispiel das Lysin-Analogon S-(2-Aminoethyl)-Cystein oder auxotroph
30 für regulatorisch bedeutsame Metabolite sind und L-Aminosäuren produzieren.

Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung L-

Aminosäure produzierender Stämme von Corynebacterium glutamicum eingesetzt, indem man einzelne Aminosäure-Biosynthesegene amplifiziert und die Auswirkung auf die L-Aminosäure-Produktion untersucht.

5 Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich die Aufgabe gestellt, neue Grundlagen für verbesserte Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Lysin, mit coryneformen Bakterien bereitzustellen.

10 Beschreibung der Erfindung

Wenn im Folgenden L-Lysin oder Lysin erwähnt werden, sind damit nicht nur die Basen, sondern sind auch die Salze wie z.B. Lysin-Monohydrochlorid oder Lysin-Sulfat gemeint.

15 Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Lysin, unter Verwendung von coryneformen Bakterien, die sensitiv gegen Diaminopimelinsäure-Analoga, insbesondere 4-Hydroxy-Diaminopimelinsäure, sind.

20 Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von L-Lysin, unter Verwendung von bereits L-Lysin produzierenden coryneformen Bakterien, die sensitiv gegen Diaminopimelinsäure-Analoga, insbesondere 4-Hydroxy-Diaminopimelinsäure, sind.

25 Gegenstand dieser Erfindung ist weiterhin ein Verfahren zur Herstellung von L-Lysin in dem folgende Schritte durchgeführt werden:

a) Fermentation der L-Lysin produzierenden coryneformen Bakterien, die zumindest sensitiv gegen Diaminopimelinsäure-Analoga, insbesondere 4-Hydroxy-Diaminopimelinsäure, sind;

30

- b) Anreicherung des L-Lysin im Medium oder in den Zellen der Bakterien; und
- c) Isolierung des L-Lysin oder L-Lysin enthaltenden Futtermitteladditivs aus der Fermentationsbrühe, gegebenenfalls
- 5 d) mit Bestandteilen aus der Fermentationsbrühe und/oder der Biomasse (> 0 bis 100 %).

Gegenstand der Erfindung ist ebenfalls ein Verfahren zur Herstellung coryneformen Bakterien, die sensitiv gegen

10 Diaminopimelinsäure-Analoga, insbesondere 4-Hydroxy-Diaminopimelinsäure, sind.

Die eingesetzten Stämme produzieren bevorzugt bereits vor der Sensitivität gegen 4-Hydroxy-Diaminopimelinsäure L-Lysin.

15 Unter dem Begriff Diaminopimelinsäure-Analoga werden nach der vorliegenden Erfindung Verbindungen wie

- 4-Fluoro-Diaminopimelinsäure,
- 4-Hydroxy-Diaminopimelinsäure,
- 4-Oxo-Diaminopimelinsäure oder
- 20 • 2,4,6-Triaminopimelinsäure

zusammengefasst.

Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können Aminosäuren aus Glucose, Saccharose, Laktose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder

25 aus Glycerin und Ethanol herstellen. Es kann sich um Vertreter coryneformer Bakterien insbesondere der Gattung Corynebacterium handeln. Bei der Gattung Corynebacterium ist insbesondere die Art Corynebacterium glutamicum zu

nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, L-Aminosäuren zu produzieren.

Geeignete Stämme der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere der Art *Corynebacterium glutamicum*, sind besonders die
5 bekannten Wildtypstämme

Corynebacterium glutamicum ATCC13032
Corynebacterium acetoglutamicum ATCC15806
Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870
Corynebacterium melassecola ATCC17965
10 *Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539
Brevibacterium flavum ATCC14067
Brevibacterium lactofermentum ATCC13869 und
Brevibacterium divaricatum ATCC14020

und daraus hergestellte L-Aminosäuren produzierende
15 Mutanten bzw. Stämme

wie beispielsweise die L-Lysin produzierenden Stämme

Corynebacterium glutamicum FERM-P 1709
Brevibacterium flavum FERM-P 1708
Brevibacterium lactofermentum FERM-P 1712
20 *Corynebacterium glutamicum* FERM-P 6463
Corynebacterium glutamicum FERM-P 6464
Corynebacterium glutamicum ATCC 21513
Corynebacterium glutamicum ATCC 21544
Corynebacterium glutamicum ATCC 21543
25 *Corynebacterium glutamicum* DSM 4697 und
Corynebacterium glutamicum DSM 5715.

Es wurde gefunden, dass coryneforme Bakterien, die sensitiv gegen Diaminopimelinsäure-Analoga, insbesondere 4-Hydroxy-Diaminopimelinsäure, sind in verbesserter Weise L-Lysin
30 produzieren.

Zur Erzeugung der erfindungsgemäßen gegen 4-Hydroxy-Diaminopimelinsäure sensitiven coryneformen Bakterien,

werden im Stand der Technik beschriebene Mutagenesemethoden verwendet.

Für die Mutagenese können klassische in-vivo Mutageneseverfahren unter Verwendung mutagener Stoffe wie
5 beispielsweise N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin oder ultraviolettes Licht (Miller, J. H.: A Short Course in Bacterial Genetics. A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1992) verwendet
10 werden.

Die coryneformen Bakterien, die sensitiv gegenüber 4-Hydroxy-Diaminopimelinsäure sind, können durch Ausplattieren auf 4-Hydroxy-Diaminopimelinsäure haltigen Nährmediumsplatten identifiziert werden. Hierzu eignen sich
15 in besonderem Maße Endkonzentrationen von 10g/l 4-Hydroxy-Diaminopimelinsäure im Nährmedium. Bei dieser Konzentration können 4-Hydroxy-Diaminopimelinsäure sensitive Mutanten von den unveränderten Elternstämmen durch ein verlangsamtes Wachstum unterschieden werden. Nach erfolgter Selektion
20 zeigen die 4-Hydroxy-Diaminopimelinsäure sensitive Mutanten eine verbesserte L-Lysinproduktion.

Zusätzlich kann es für die Produktion von L-Lysin vorteilhaft sein, zusätzlich zur Sensitivität gegen 4-Hydroxy-Diaminopimelinsäure eines oder mehrere Enzyme des
25 jeweiligen Biosyntheseweges, der Glykolyse, der Anaplerotik, des Zitronensäure-Zyklus, des Pentosephosphat-Zyklus, des Aminosäure-Exports und gegebenenfalls regulatorische Proteine zu verstärken, insbesondere überzuexprimieren. Die Verwendung endogener Gene wird im
30 allgemeinen bevorzugt.

Unter „endogenen Genen“ oder „endogenen Nukleotidsequenzen“ versteht man die in der Population einer Art vorhandenen Gene beziehungsweise Nukleotidsequenzen.

Der Begriff „Verstärkung“ bzw. „Verstärken“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme bzw. Proteine in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise die Kopienzahl des Gens bzw. der Gene erhöht, einen starken Promotor oder ein Gen oder Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym bzw. Protein mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

- 10 Durch die Maßnahmen der Verstärkung, insbesondere Überexpression, wird die Aktivität oder Konzentration des entsprechenden Proteins im allgemeinen um mindestens 10%, 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 200%, 300%, 400% oder 500%, maximal bis 1000% oder 2000% bezogen auf die des Wildtyp-Proteins beziehungsweise der Aktivität oder Konzentration des Proteins im Ausgangs-Mikroorganismus erhöht.

So kann für die Herstellung von L-Lysin zusätzlich zur Sensitivität gegen 4-Hydroxy-Diaminopimelinsäure eines oder mehrere der Gene ausgewählt aus der Gruppe

- 20 • das für eine feed-back resistente Aspartatkinase kodierende Gen *lysC* (Accession No.P26512, EP-B-0387527; EP-A-0699759; WO 00/63388),
- das für die Dihydrodipicolinat-Synthase kodierende Gen *dapA* (EP-B 0 197 335),
- 25 • das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen *gap* (Eikmanns (1992). Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- gleichzeitig das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen *pyc* (DE-A-198 31 609, EP-A-1108790),
- 30 • das für die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase kodierende Gen *zwf* (JP-A-09224661, EP-A-1108790),

- gleichzeitig das für den Lysin-Export-Protein kodierende Gen *lyeE* (DE-A-195 48 222),
 - das für das *Zwa1*-Protein kodierende Gen *zwa1* (DE: 19959328.0, DSM 13115),
- 5 • das für die Diaminopimelinsäure Decarboxylase kodierende Gen *lysA* (Accession Nr. X07563),
- das für den Sigma-Faktor C kodierende Gen *sigC* (DE: 10043332.4, DSM14375),
- 10 • das für die Triosephosphat Isomerase kodierende Gen *tpi* (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086) und
- das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende Gen *pgk* (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086),
- verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.
- 15 Weiterhin kann es für die Produktion von L-Lysin, vorteilhaft sein, zusätzlich zur Sensitivität gegen 4-Hydroxy-Diaminopimelinsäure gleichzeitig eines oder mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
- das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase kodierende Gen *pck* (DE 199 50 409.1, DSM 13047),
 - das für die Glucose-6-Phosphat-Isomerase kodierende Gen *pgi* (US 09/396,478, DSM 12969),
 - das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen *poxB* (DE:1995 1975.7, DSM 13114),
- 25 • das für die DNA-Helikase kodierende Gen *deaD* (DE: 10047865.4, DSM14464),
- das für die Citrat Lysase kodierende Gen *citE* (PCT/EP01/00797, DSM13981),

- das für die O-Succinylbenzoesäure-CoA-Ligase kodierende Gen menE (DE: 10046624.9, DSM14080),
 - das für den Transkriptionsregulator Mike17 kodierende Gen mike17 (DE: 10047867.0, DSM14143) und
- 5 • das für das Zwa2-Protein kodierende Gen zwa2 (DE: 19959327.2, DSM 13113)

abzuschwächen, insbesondere die Expression zu verringern.

Der Begriff „Abschwächung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Verringerung oder Ausschaltung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme (Proteine) in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man beispielsweise einen schwachen Promotor verwendet oder ein Gen bzw. Allel verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer niedrigen Aktivität kodiert bzw. das entsprechende Gen oder Enzym (Protein) inaktiviert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Durch die Maßnahmen der Abschwächung wird die Aktivität oder Konzentration des entsprechenden Proteins im allgemeinen auf 0 bis 75%, 0 bis 50%, 0 bis 25%, 0 bis 10% oder 0 bis 5% der Aktivität oder Konzentration des Wildtyp-Proteins, beziehungsweise der Aktivität oder Konzentration des Proteins im Ausgangs-Mikroorganismus, herabgesenkt.

Schließlich kann es für die Produktion von L-Lysin, vorteilhaft sein, neben der Sensitivität gegen 4-Hydroxy-Diaminopimelinsäure unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: „Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms“, in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung und können

kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Produktion von L-Lysin kultiviert werden.

- 5 Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden ist im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.
- 10

Das zu verwendende Kulturmedium muss in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme genügen.

- Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch „Manual of Methods for General Bacteriology“, der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten.
- 15

Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Laktose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z.B.

- 20 Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z.B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z.B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z.B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

- 25 Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff-haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und
- 30 Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden.

Das Kulturmedium muss weiterhin Salze von Metallen
enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die
für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können
essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine
5 zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden.
Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen
zugemischt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur
Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder
in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert
10 werden.

Zur pH-Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen
wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw.
Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure
oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur
15 Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie
z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur
Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem
Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe wie z.B.
Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen
20 aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff-
haltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur
eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise
bei 20°C bis 45°C und vorzugsweise bei 25°C bis 40°C. Die
Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des
25 gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird
normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden
erreicht.

Methoden zur Bestimmung von L-Lysin sind aus dem Stand der
Technik bekannt. Die Analyse kann so wie bei Spackman et
30 al. (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) beschrieben
durch Anionenaustauschchromatographie mit anschließender
Ninhydrin Derivatisierung erfolgen, oder sie kann durch
reversed phase HPLC erfolgen, so wie bei Lindroth et al.
(Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174) beschrieben.

Das erfindungsgemäße Verfahren dient zur fermentativen Herstellung von L-Lysin.

Die Konzentration von L-Lysin kann gegebenenfalls durch den Zusatz von L-Lysin auf den gewünschten Wert eingestellt
5 werden.

Durch die beschriebenen Verfahren gelingt es coryneforme Bakterien zu isolieren, die sensitiv gegen Diaminopimelinsäure-Analoga, insbesondere 4-Hydroxy-Diaminopimelinsäure, sind, und nach den beschriebenen
10 Fermentationsverfahren in verbesserter Weise L-Lysin produzieren.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von L-Lysin, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, dass man folgende Schritte
durchführt,
 - 5 a) Fermentation der L-Lysin produzierenden coryneformen
Bakterien, die zumindest sensitiv gegen
Diaminopimelinsäure-Analoga, insbesondere 4-Hydroxy-
Diaminopimelinsäure, sind;
 - b) Anreicherung des L-Lysin im Medium oder in den
10 Zellen der Bakterien; und
 - c) Isolierung des L-Lysin oder L-Lysin enthaltenden
Futtermitteladditivs aus der Fermentationsbrühe,
gegebenenfalls
 - d) mit Bestandteilen aus der Fermentationsbrühe und/oder
15 der Biomasse (> 0 bis 100 %).
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, dass man Bakterien
einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des
Biosyntheseweges des L-Lysin verstärkt.
- 20 3. Verfahren gemäß Anspruch 1, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, dass man Bakterien
einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest
teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung des L-
Lysin verringern.
- 25 4. Verfahren gemäß Anspruch 1, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, dass man für die
Herstellung von L-Lysin coryneforme Mikroorganismen
fermentiert, in denen man gleichzeitig eines oder
mehrere der Gene, ausgewählt aus der Gruppe
 - 30 4.1 das für eine feed-back resistente
Aspartatkinase kodierende Gen lysC,

- 4.2 das für die Dihydrodipicolinat-Synthase
kodierende Gen *dapA*,
- 4.3 das für die Glyceraldehyd-3-Phosphat
Dehydrogenase kodierende Gen *gap*,
- 5 4.4 das für die Pyruvat Carboxylase kodierende Gen
pyc,
- 4.5 das für die Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase
kodierende Gen *zwf*,
- 10 4.6 gleichzeitig das für den Lysin-Export-Proteins
kodierende Gen *lysE*,
- 4.7 das für das Zwa1-Protein kodierende Gen *zwa1*,
- 4.8 das für die Diaminopimelinsäure Decarboxylase
kodierende Gen *lysA*,
- 4.9 das für den Sigma-Faktor C kodierende Gen *sigC*,
- 15 4.10 das für die Triosephosphat Isomerase kodierende
Gen *tpi*, oder
- 4.11 das für die 3-Phosphoglycerat Kinase kodierende
Gen *pgk*,

verstärkt, insbesondere überexprimiert.

- 20 5. Verfahren gemäß Anspruch 1, d a d u r c h
g e k e n n z e i c h n e t, dass man zur Herstellung
von L-Lysin coryneforme Mikroorganismen fermentiert, in
denen man gleichzeitig eines oder mehrere der Gene,
ausgewählt aus der Gruppe

- 25 5.1 das für die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
kodierende *pck*-Gen,
- 5.2 das für die Glucose-6-Phosphat Isomerase
kodierende *pgi*-Gen,

- 5.3 das für die DNA-Helikase kodierende Gen *deaD*,
- 5.4 das für die Citrat Lysase kodierende Gen *citE*,
- 5.5 das für die O-Succinylbenzoesäure-CoA-Ligase kodierende Gen *meine*,
- 5 5.6 das für den Transkriptionsregulator *MikE17* kodierende Gen *mikE17*,
- 5.7 das für die Pyruvat-Oxidase kodierende Gen *poxB*, oder
- 5.8 das für das *Zwa2*-Protein kodierende Gen *zwa2*,
- 10 abschwächt.
6. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, dass man Mikroorganismen der Art *Corynebacterium glutamicum* einsetzt.
- 15 7. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t, dass man Mikroorganismen der Art *Corynebacterium glutamicum* einsetzt, die sensitiv gegen 4-Hydroxy-Diaminopimelinsäure sind.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von L-Lysin, bei dem man folgende Schritte durchführt:

- 5 a) Fermentation der L-Lysin produzierenden coryneformen Bakterien, die zumindest sensitiv gegen Diaminopimelinsäure-Analoga, insbesondere 4-Hydroxy-Diaminopimelinsäure, sind;
 - b) Anreicherung des L-Lysin im Medium oder in den Zellen der Bakterien; und
 - 10 c) Isolierung des L-Lysin oder L-Lysin enthaltenden Futtermitteladditivs aus der Fermentationsbrühe, gegebenenfalls
 - d) mit Bestandteilen aus der Fermentationsbrühe und/oder der Biomasse (> 0 bis 100 %).
- 15 und gegebenenfalls Bakterien einsetzt, in denen man zusätzlich weitere Gene des Biosyntheseweges des L-Lysin verstärkt, oder Bakterien einsetzt, in denen die Stoffwechselwege zumindest teilweise ausgeschaltet sind, die die Bildung des L-Lysin verringern.